

①9 BUNDESREPUBLIK  
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES  
PATENTAMT

⑫ **Offenlegungsschrift**  
⑪ **DE 3409501 A1**

⑤1 Int. Cl. 4:  
**C12N 5/02**  
C 12 M 3/00

②1 Aktenzeichen: P 34 09 501.2  
②2 Anmeldetag: 15. 3. 84  
④3 Offenlegungstag: 24. 10. 85

⑦1 Anmelder:  
Sandoz-Patent-GmbH, 7850 Lörrach, DE

⑦2 Erfinder:  
Scheirer, Winfried, Ing., Wiener Neudorf, AT;  
Katinger, Hermann, Prof. Dipl.-Ing. Dr., Wien, AT

⑤4 Verfahren zur Kultivierung von Zellen

Die Erfindung betrifft Verfahren zum Kultivieren von tierischen, humanen und pflanzlichen Zellen sowie Hybridzellen und Mikroorganismen.

*[Faint, illegible stamp or signature]*

DE 3409501 A1

DE 3409501 A1

3409501

SANDOZ-Patent-GMBH  
7850 Lörrach

-X-

900-9397

Patentansprüche:

1. Verfahren zum Kultivieren von tierischen, humanen, pflanzlichen Zellen sowie Hybridzellen und Mikroorganismen, dadurch gekennzeichnet, daß sich diese Zellen in Kammern befinden, die zumindest teilweise durch flächige Membranen begrenzt sind, und durch diese Membranen ein Stoffaustausch zur Ver- und Entsorgung der Zellen mit gelösten bzw. gasförmigen Nährstoffen bzw. Stoffwechselprodukten erfolgt, wobei durch diese Membranen die Zellen im wesentlichen zurückgehalten werden.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß eine minimale funktionelle Einheit aus zwei Kammern, einer Zellkammer und einer Mediumkammer, besteht.
3. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß eine minimale funktionelle Einheit aus drei Kammern, einer Zellkammer, einer Mediumkammer und einer Produktkammer bzw. einer Gaskammer, besteht.
4. Verfahren nach den Ansprüchen 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß die minimale funktionelle Einheit beliebig zu größeren funktionellen Einheiten linear erweitert werden kann.
5. Verfahren nach den Ansprüchen 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß die Kammern unabhängig voneinander oder nach Gruppen zusammengefaßt durchströmt und/oder mit Druck beaufschlagt werden können.
6. Verfahren nach den Ansprüchen 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß die Membranen symmetrischen oder asymmetrischen Aufbau haben, polar oder unpolar, hydrophil oder hydrophob, gasdicht oder gaspermeabel sind, aus nicht zelltoxischem Material bestehen, in der Durchlässigkeit frei wählbar sind, jedoch die Zellen im wesentlichen zurückhalten.
7. Verfahren nach den Ansprüchen 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, daß das gewünschte Zellprodukt zusammen mit den Zellen zurückgehalten wird,

nichterwünschte Stoffwechselprodukte und andere Stoffe abgetrennt werden.

8. Verfahren nach den Ansprüchen 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, daß das gewünschte Zellprodukt gemeinsam mit Stoffwechselprodukten von den Zellen abgetrennt wird.

9. Verfahren nach den Ansprüchen 1 und 3 bis 8, dadurch gekennzeichnet, daß in einem System Membranen mit unterschiedlichen Eigenschaften gleichzeitig verwendet werden.

10. Verfahren nach den Ansprüchen 1 bis 9, dadurch gekennzeichnet, daß in das System weitere Membranen zusätzlich integriert werden können.

11. Verfahren nach den Ansprüchen 1 bis 10, dadurch gekennzeichnet, daß die Tiefe der Kulturkammern, normal auf die Membranoberfläche gemessen, den Erfordernissen der Zellen und der sonstigen Betriebsbedingungen angepaßt ist und vorzugsweise 1-10 mm beträgt.

12. Verfahren nach den Ansprüchen 1 bis 11, dadurch gekennzeichnet, daß je nach Betriebsweise die Methoden der Perfusionskultur, der Dialysekultur wahlweise mit der Batchkultur der einströmigen und mehrströmigen homogenen und heterogenen kontinuierlichen Betriebsweise kombiniert und damit den Prozeßerfordernissen optimal angepaßt werden.

13. Verfahren nach den Ansprüchen 1 bis 12, dadurch gekennzeichnet, daß durch entsprechende Verbindung der Kulturkammern die Betriebscharakteristik eines Röhrenreaktors beliebiger Länge erreicht wird, wobei eine ausreichende Nährstoffversorgung durch parallel-, gleich- oder gegenströmige Führung des Medienstromes gewährleistet wird.

14. Vorrichtung zur Durchführung des Verfahrens nach Anspruch 1 bis 13, bestehend aus zwei oder mehreren, durch Membranen getrennte Kammern, die einzeln oder in beliebig zu schaltenden Gruppen durchströmbar sind.

15-05-84

3409501

- 3 -

900-9397

15. Vorrichtung nach Anspruch 16, die aus einem nicht zelltoxischen Material gefertigt ist und sterilisiert werden kann.

### Verfahren zur Kultivierung von Zellen

Die Erfindung betrifft Verfahren zum Kultivieren von tierischen, humanen und pflanzlichen Zellen sowie Hybridzellen und Mikroorganismen.

Zellen höherer Enkaryonten (tierische Zellen, humane Zellen, Pflanzenzellen und Mikroorganismen) sind in vitro durch folgende Eigenschaften charakterisiert:

1. Wachstum in komplexen Nährmedien.
2. Hohe Empfindlichkeit gegenüber mechanischen und hydraulischen Schereffekten.
3. Hohe Empfindlichkeit gegenüber physikalischen und chemischen Umwelteinflüssen.
4. Weitgehende Abhängigkeit von einer ausgeglichenen Versorgung mit Nährstoffen und Entsorgung der Stoffwechselprodukte.
5. Die Kinetik der Produktbildung kann sowohl an das Zellwachstum gebunden sein wie auch unabhängig davon erfolgen.
6. Die Produkte werden entweder ausgeschieden oder sind zellassoziiert.

Bei der Züchtung von Zellen werden diese mit Nährstoffen aus dem sie umgebenden Nährmedium versorgt und die Stoffwechselprodukte der Zellen werden in das Medium abgegeben. Wenn das die Zellen enthaltende fluide Nährmedium in einem Behälter ruhig steht, so setzen sich die Zellen wegen ihres größeren spezifischen Gewichtes am Behältnisboden ab und/oder lagern sich an den Behältniswänden an. Die sich daraus ergebenden hohen Zelldichten haben zur Folge, daß die Diffusion zum Nährstoffnachschub bzw. zur Entsorgung von Stoffwechselprodukten nicht ausreicht und die Zellen absterben. Darüber hinaus ist zur Erlangung von hohen Zelldichten, wie sie bei Produktionsprozessen vielfach gewünscht werden, ein Nachschub und/oder Austausch bzw. Regenerierung des Mediums notwendig. Üblicherweise muß daher die Zellsuspension entweder in sehr dünnen Schichten kultiviert werden oder für eine ständige Aufrechterhaltung der

Suspension gesorgt werden, bzw. müssen die Zellen beim Mediumnachschub bzw. Mediumtausch kurzfristig vom Medium separiert werden.

Im Zusammenhang mit der geringen mechanischen (physikalischen) und chemischen Belastbarkeit ergeben sich aus den notwendigen Maßnahmen wie Rühren, Füllen, Zentrifugieren, Filtrieren, Sterilhalten usw. große Probleme bei der Überführung von solchen Kultivierungsverfahren vom Labormaßstab zur technischen und großtechnischen Anwendung. Durch die bisher in der Literatur beschriebenen Verfahren, z.B. S.R. Adamson et. al., Biotechn. Letters 5(9)/573-578(1983); Franklin Lim et. al., J. Pharm. Soc. 70(4)/351-354(1981); J. Feder et al., Scient. American 248(1)/36-43(1983), konnten diese Nachteile nicht beseitigt werden.

Die vorliegende Erfindung besitzt diese Nachteile nicht. Insbesondere betrifft die Erfindung Verfahren zum Kultivieren von tierischen, humanen, pflanzlichen und Hybridzellen sowie Mikroorganismen, bei welchen die vorstehend geschilderten Probleme vermieden sind und die sich auf Zellkulturen im beliebigem Maßstab anwenden lassen.

Das erfindungsgemäße Verfahren ist dadurch gekennzeichnet, daß die Zellen in Kulturkammern gezüchtet werden, die von Membranen und deren Haltevorrichtungen, Anschlüssen, usw. begrenzt sind. Auf der anderen Seite der Membranen befinden sich ebenfalls Kammern, die mit Nährmedium ganz oder teilweise gefüllt sind. Die Nährmediumzufuhr erfolgt vorzugsweise durch die Poren der Membrane entweder durch Diffusion oder durch Massenfluß. Eine direkte Nährmediumzufuhr in diese Kulturkammern ist gleichfalls möglich. Ebenso können Produkte der Zellen durch die Membrane(n) abgeführt aber auch - wählbar durch die Durchlässigkeit der Membrane - im Kulturraum zurückgehalten werden. Die Medien können kontinuierlich oder diskontinuierlich durch die Kammern geführt werden, wobei das Medium außerhalb oder innerhalb der Mediumkammern konditioniert (chemisch oder physikalisch behandelt, usw.) werden kann.

Der Gesamtaustausch (Ver- und Entsorgung) von Gasen, wie  $O_2$ ,  $CO_2$  usw.

kann entweder durch externe oder interne Anreicherung im Kulturmedium in gelöster Form oder als Gas/Flüssigkeits-Dispersion erfolgen, aber auch durch gaspermeable Membranen beliebiger Form durchgeführt werden. Dies kann entweder analog den Medienströmen oder durch Einsatzmembranen, z.B. Schläuche, die durch die Kulturkammern geführt werden, erfolgen.

Die Membranen können aus jedem brauchbaren Material sein und jede brauchbare Porengröße haben. Sie können symmetrisch oder asymmetrisch, polar oder unpolar, hydrophil oder hydrophob sein und müssen in ihrer Stärke dem System angepaßt werden. Die Membranen müssen jedoch so beschaffen sein, daß im wesentlichen die Zellen zurückgehalten werden. Im wesentlichen gelten die genannten Kriterien auch für gaspermeable Membranen. Die Höhe der Kammer zwischen den bevorzugt horizontal liegenden Membranen ist durch die Nährmediumzufuhr und die gewünschten Zelldichten begrenzt. Die Kulturkammer kann mit Einbauten zum Stützen der Membranen und/oder zur Erzeugung von Konvektion und/oder zur kontrollierten Leitung oder Suspension versehen werden. Die Mediumkammer(n) sind in ihrem Volumen nur durch den gewünschten Durchfluß bzw. durch Leiteinrichtungen zur Steuerung der Konvektion und der Strömung sowie das gewünschte Volumen begrenzt.

Kulturkammern können als Stapel mit gemeinsamen Zu- und Ablaufkanälen aufgebaut werden, wobei entweder ein Zweikammersystem (Medium/Zellen) oder ein Dreikammersystem (Medium/Zellen/Produkt) als minimale funktionelle Einheit angewendet werden kann. Die Anzahl der Kammern in einem Stapel kann jedoch beliebig gewählt werden, die Fläche der Kulturkammern ist durch die produktionsbedingte Maximalgröße der Membranen begrenzt.

Durch dieses erfindungsgemäße Verfahren werden den Zellen auf schonende Weise ausreichend Nährstoffe zugeführt sowie Stoffwechselprodukte abgeführt. Ein schädlicher physikalischer oder chemischer Einfluß kann durch die Membranen von den Zellen ferngehalten werden. Durch die Anordnung der Membrankammern in Stapeln ist eine hohe Volumenausnutzung und

damit die Möglichkeit, technisch relevante Kulturgrößen als Einheitsoperation zu erreichen, gegeben.

Die Betriebsweise dieser für das erfindungsgemäße Verfahren verwendeten Kulturkammern läßt sich ideal auf die Produktionskinetik abstimmen. Dies wird dadurch gewährleistet, daß eine Immobilisierung der Zellen in einem gewünschten Ausmaß erreicht wird und sowohl Zellseite als auch Medium- und gegebenenfalls Produktseite getrennt kontinuierlich oder diskontinuierlich durchströmt werden können. Die Vorteile der bekannten Verfahren der Zellimmobilisierung (-verkapselung), der Dialysekultur und der Perfusionskultur können mit der Methode der Batchkultur, der einströmigen und mehrströmigen kontinuierlichen Betriebsweise dadurch kombiniert werden. Es ist daher möglich, für jede beliebige Produktionskinetik die ideale Betriebsweise zu wählen. Weiters kann das erfindungsgemäße Verfahren für biokatalytische Umwandlungen von Substraten zu Produkten verwendet werden. Das erfindungsgemäße Verfahren ergibt eine leichtere Bearbeitbarkeit und bessere Kontrollierbarkeit sowie die Möglichkeit der kontrollierten Durchströmung und der Meßwerterfassung im Kulturraum. Im Vergleich zum komplizierten Verfahren der Mikroverkapselungstechnik gewährleisten weit einfachere und kleinere Anlagen eine bessere Kontrollierbarkeit und liefern dabei gleich gute oder bessere Ergebnisse.

Die Abbildungen sollen beispielsweise Ausführungsformen der für die Ausführung des erfindungsgemäßen Verfahrens geeigneten Kulturmembrankammern zeigen, ohne daß sie den Umfang der Erfindung einschränken.

Abbildung 1: Schematische Darstellung eines Zweikammersystems und dessen Betriebsweise.

In den Kammern (1), Kulturkammer, befinden sich die Zellen, z.B. Hybridzellen aus einer Myelomzelle und einer weißen Blutzelle. Die Kulturkammer ist durch die Membranen (2) von den Medienkammern (3) getrennt. Die Kammern können durch getrennte Zuläufe (4,5) bzw. getrennte Abläufe (6,7) mit variabler Durchlaufgeschwindigkeit beschickt werden, z.B. mit



Medium (z.B. Dulbecco's MEM mit 10% foet. Kalbserum). Eine Batchkultur kann durch Füllen von Zellinokulum und Nährmedium in die entsprechenden Kammern durchgeführt werden. Durch periodisches Wechseln des Mediums in den Mediumkammern wird eine Batchcharakteristik erreicht. Eine Perfusionskultur bzw. (je nach Membran) Dialysekultur wird erreicht, indem die Anschlüsse 5 und 7 geschlossen bleiben und über 4 und 6 Medium kontinuierlich durchgeleitet wird. Eine Kombination Batchkultur/kontinuierliche Kultur ist sowohl für die Medium- wie auch für die Kulturseite möglich.

#### Abbildung 2:

Wie aus Abbildung 2 ersichtlich, kann die Kultivierung der Zellen nach der Charakteristik eines kontinuierlichen Röhrenreaktors beliebiger Länge durchgeführt werden, wobei die Nährstoffversorgung aus den parallel (Gleich- oder Gegenströmung) durchströmten Mediumkammern gewährleistet bleibt, und sämtliche Vorteile der Perfusions- bzw. Dialysekultur aufrecht bleiben. Mit dieser Anordnung können alle physiologischen Zustände einer Kultur auf kontinuierlicher Basis aufrecht erhalten werden.

#### Abbildung 3: Dreikammersystem

Das Dreikammersystem ist in Abbildung 3 dargestellt. Es unterscheidet sich vom Zweikammersystem dadurch, daß auf jeder Seite der Kulturkammer eine Membrane mit unterschiedlichen oder gleichen Eigenschaften angebracht ist, um eine Differenzierung zwischen Substrat und Produktseite zu ermöglichen. Die Substratkammer (9) sowie die Produktkammer (8) sind durch getrennte Anschlüsse bedienbar. Auch hier ist jede schon vorher beschriebene Betriebsweise möglich.

#### Abbildung 4: Kultivierungsvorrichtung

Abbildung 4 zeigt den prinzipiellen Aufbau einer derartigen Kultivierungsvorrichtung. Sie besteht aus zwei Deckplatten (10), zwischen welchen Membranen (11) und gegebenenfalls Haltevorrichtungen, Leiteinrichtungen und/oder Distanzvorrichtungen (12) in geeigneter Weise liegen. Durch

Bohrungen, welche in ihrer Anzahl und Lokalisation auf die Kultivierungsmethode abgestimmt sind, sind die Kammern verbunden (13). Die Deckplatten bzw. die Haltevorrichtungen können gleichzeitig der Aufnahme von Sonden aller Art dienen (14). Die Temperierung erfolgt vorzugsweise mit dem Mediumstrom, kann aber auch durch Mantelung oder durch Nutzung der Deckplatten und Haltevorrichtungen als Wärmetauscher erfolgen. Die Form des gesamten Apparates kann der Problemstellung und den Strömungseigenschaften gemäß beliebig gewählt werden.

Weitere Merkmale und Vorteile der Erfindung werden nachfolgend an einem Anwendungsbeispiel näher erläutert:

Beispiel:

Die Kulturkammern werden mit Zelluloseacetatmembranen von  $0,2\ \mu\text{m}$  Porengröße bestückt, die Zu- und Ablaufkanäle von Kultur- und Mediumkammern parallel zusammengefaßt und der Apparat sterilisiert.

Die Kulturkammern werden mit einer Zellsuspension der Hybridom-Zelllinie C28 befüllt. Es ist dies eine Hybridomzelllinie zwischen primären Humanzellen und einer Mäusemyelomzelllinie. Sie produziert humanes IgG1 und scheidet dieses in das umgebende Medium aus. Dieses Kulturmedium besteht aus 90 % Dulbecco's MEM und 10 % foetalem Kalbserum. Die Startzelldichte beträgt 500.000 Zellen/ml. Die Kultivierungstemperatur ist  $36,5^\circ$ . In den Mediumkanälen wird Kulturmedium, das mittels einer Airliftpumpe mit Luft angereichert wird, umgepumpt und mit einem Volumenäquivalent des Kulturkammervolumens täglich durchströmt. Nach drei Tagen ist eine Zelldichte von  $1,8 \times 10^6$  Zellen/ml erreicht, die IgG1-Konzentration auf der Mediumseite beträgt etwa 30 mg/Liter. Die Globulinkonzentration steigt allmählich auf etwa 100 mg/Liter und stabilisiert sich nach einer weiteren Woche.

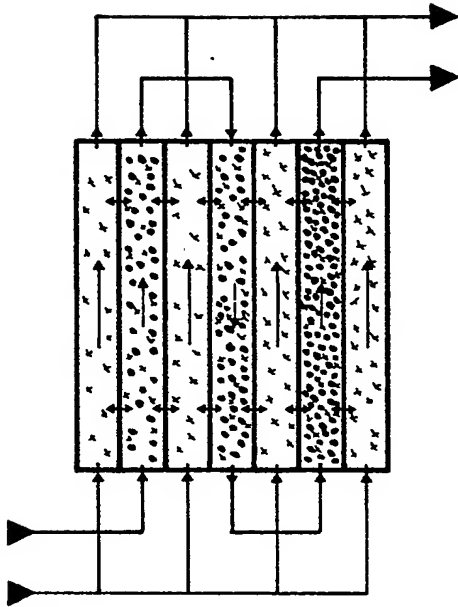


Abb. 2

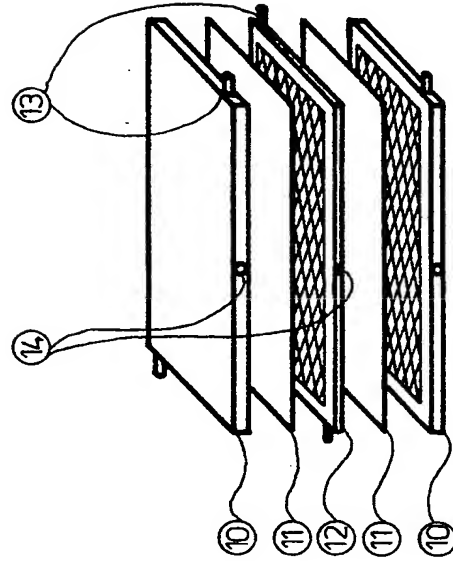


Abb. 4

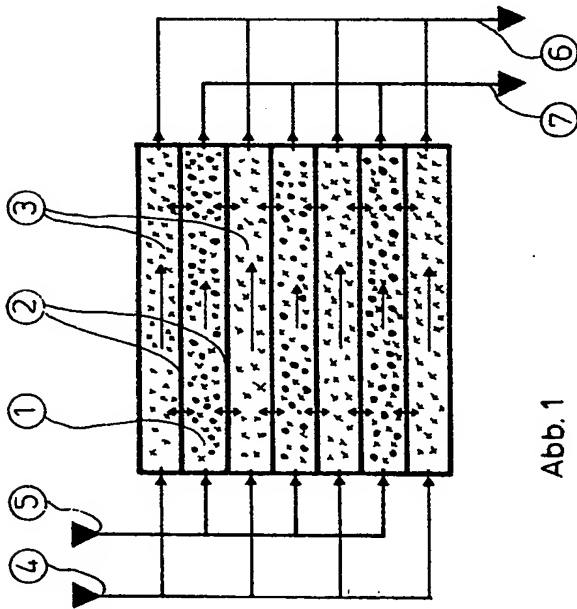


Abb. 1

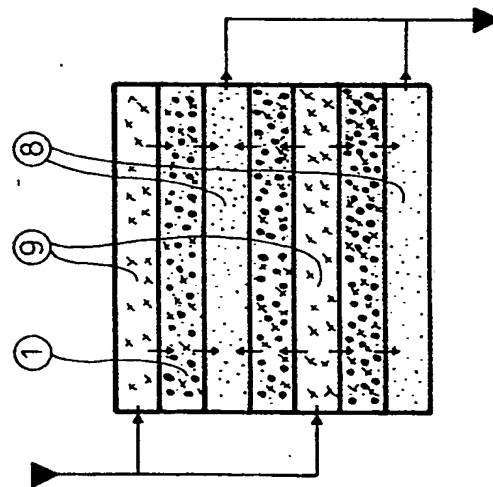


Abb. 3

· 10 ·  
- Leerseite -

## **Process and apparatus for the culture of human, animal, plant and hybrid cells and microorganisms.**

Veröffentlichungsnr. (Sek.) ☐ EP0155237, A3, B1  
Veröffentlichungsdatum : 1985-09-18  
Erfinder : KATINGER HERMANN DR; SCHEIRER WINFRID  
Anmelder : MBR BIO REACTOR AG (CH)  
Veröffentlichungsnummer : ☐ DE3409501  
Aktenzeichen:  
(EPIDOS-INPADOC-normiert) EP19850810103 19850311  
Prioritätsaktenzeichen:  
(EPIDOS-INPADOC-normiert) DE19843409501 19840315  
Klassifikationssymbol (IPC) : C12M3/02; C12M1/12  
Klassifikationssymbol (EC) : C12M1/12, C12M3/06B  
Korrespondierende Patentschriften ☐ JP60210982  
Cited patent(s): EP0112155; FR2324365; FR2393849; US3186917; DE839245

### **Bibliographische Daten**

1. Process for the culture of human, animal, plant and hybrid cells and micro-organisms in a bioreactor having at least three adjacent chambers, whereby at least one first chamber is a cell culture chamber (1), a second chamber is a medium chamber (2) and a third chamber is a product chamber (3), and the individual chambers are delimited from one another by membranes (A, B), characterised in that the cells are immobilised within the cell culture chamber (1) on carriers of net-like tissues (25, 25') which mechanically support the membranes (A, B), and in that their frame-like edges (27, 27', 28, 28') serve as a seal and simultaneously as spacers, whereby a medium chamber (2) containing nutrient solution enriched with an oxygen-containing gas is continuously flowed through in its longitudinal direction, and in that the product is only drawn off from the cell culture chamber (1) discontinuously.

Daten aus der esp@cenet Datenbank - - I2

